

METHOD FOR PRODUCING POLYESTER

Patent Number: JP2001340078
Publication date: 2001-12-11
Inventor(s): YOKOMIZO SATOSHI; FUKUCHI TAKESHI; ODAWARA OSAMU; MATSUMOTO KEIJI; DOI YOSHIHARU
Applicant(s): KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD;; INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES
Requested Patent: ☐ JP2001340078
Application Number: JP20000164584 20000601
Priority Number (s):
IPC Classification: C12N15/09; C12N1/21; C12P7/62
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a polyester by which the molar fraction of 3-hydroxyhexanoic acid (3HH) is controlled and a copolyester P[3- hydroxybutyric acid (3HB)-co-3HH] having various molar fractions of the 3HH is stably produced with high productivity.
SOLUTION: This method is to produce the copolyester P(3HB-co-3HH) in which the 3HB represented by the following formula (1) is copolymerized with the 3HH represented by the following formula (2) using a microorganism and the method for producing the polyester comprises using any of a combination of oils and fats different in number of carbons, a combination of fatty acids different in the number of carbons or a combination of the oils and fats with the fatty acids different in the number of carbons as at least two kinds of carbon sources and thereby collecting the polyester different in the molar fraction of the 3HH.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-340078

(P2001-340078A)

(43) 公開日 平成13年12月11日 (2001. 12. 11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/62		(C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 R 1: 05)	
C 1 2 R 1: 05)		(C 1 2 P 7/62	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-164584(P2000-164584)	(71) 出願人	000000941 鎭源化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22) 出願日	平成12年6月1日 (2000. 6. 1)	(71) 出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
		(72) 発明者	横溝 聡 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三育荘
		(72) 発明者	福地 健 兵庫県明石市朝霧町3-123セゾン朝霧304
		(74) 代理人	100086586 弁理士 安富 康男 (外2名)
		最終頁に続く	

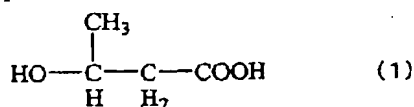
(54) 【発明の名称】 ポリエステルの製造方法

(57) 【要約】

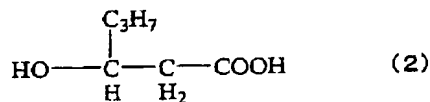
【課題】 3HHモル分率を制御し、様々な3HHモル分率を有するP(3HB-co-3HH)を高い生産性でかつ安定して製造するポリエステルの製造方法を提供する。

【解決手段】 微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合体ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取するポリエステルの製造方法。

【化1】



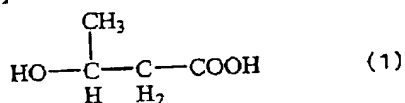
【化2】



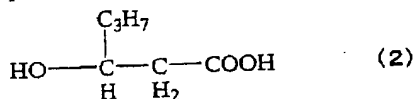
【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【化1】



【化2】



【請求項2】 炭素源として用いる油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、3HHモル分率を制御する、請求項1記載のポリエステルの製造方法。

【請求項3】 前記油脂がヤシ油、パーム油、パーム核油及びヘキサン酸トリグリセリドからなる群より選択される油脂である請求項1又は2記載のポリエステルの製造方法。

【請求項4】 前記脂肪酸が炭素数が6～10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル及び脂肪酸塩からなる群より選択される脂肪酸である請求項1又は2記載のポリエステルの製造方法。

【請求項5】 前記ポリエステルの3HHモル分率が1～40mol%であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項6】 前記微生物がアエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)より単離されたポリエステル重合酵素遺伝子を含む組換えベクターにより、形質転換された微生物である請求項1～5のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【請求項7】 前記微生物が*Alcaligenes eutrophus*(*Ralstonia eutropha*)であることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載のポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は共重合ポリエステルの発酵生産による製造方法に関する。詳しくは、自然環境(土中、河川、海中)の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の製造方法に関するもの

である。

【0002】

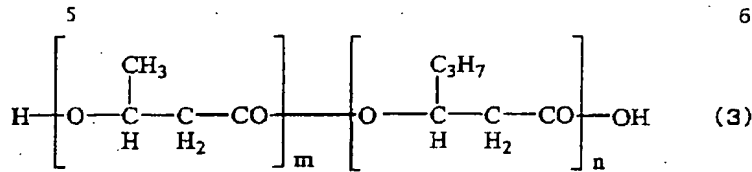
【従来の技術】 現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(以下、P(3HB)と略す)である。P(3HB)は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されている。しかし、P(3HB)は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲に限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【0003】 其中、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)とからなる共重合体P(3HB-co-3HV)の製造方法が開示されている。このP(3HB-co-3HV)はP(3HB)に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。これらの公報における共重合体の製造方法は、P(3HB)の製造方法と同様に、前段で菌体を増殖させ、後段で窒素またはリンを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものであった。

【0004】 またP(3HB-co-3HV)については、3HVのモル分率が増えるにつれて柔軟性が変化するから、3HVのモル分率を制御する研究もなされてきた。例えば、特開昭57-150393号公報、特開昭63-269989号公報ではプロピオン酸を使用し、また特公平7-79705号公報ではプロパン-1-オールを使用し、それらの培地中への添加量を変えることにより3HVのモル分率を制御しており、3HVモル分率が10～90mol%のP(3HB-co-3HV)が製造されている。しかしながら、実際のところP(3HB-co-3HV)は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取手など硬質成形体の分野にしか利用されなかった。

【0005】 近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(以下、3HHと略す)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。

【0006】 また、P(3HB-co-3HH)の性質に関する研究もなされている(Y. Doi, S. Kit



【0017】式中、 m 及び n は、同じか又は異なって、1以上の整数を表す。本発明のポリエステル製造方法において、使用する微生物には特に制限なく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されている *Alcaligenes* (*Ralstonia*) 属や *Aeromonas* 属、*Escherichia* 属などの細菌類を使用することが出来るが、*Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) を使用することが好ましい。

【0018】また、本発明のポリエステル製造方法に用いられる微生物は、ポリエステル重合酵素遺伝子を含む組換えベクターにより、形質転換された微生物であることが好ましい。形質転換体を作製する場合はベクターには、その菌内で自立的に増殖しうるプラスミドベクターを用いることができるが、染色体に組み込まれていても良い。ポリエステル重合遺伝子は構造遺伝子のほかに、プロモーター、ターミネーターなど宿主菌で機能する発現ユニットを有していればよい。本発明のポリエステルの製造方法において用いられるポリエステル重合遺伝子は、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) より単離された遺伝子が好ましく、例えば特開平10-108682号公報に記載されている遺伝子断片を用いることができる。

【0019】微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (Lederberg, E. M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1. 8, 4頁, 1994年) 等を用いることができる。

【0020】(ポリエステルの製造方法) 本発明のポリエステルの製造方法においては、微生物を培養する際に、上記のように少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用い、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、そのほかの有機栄養源を含む培地が使用できる。なお、上記炭素数の異なる油脂とは、油脂を構成する脂肪酸のうち、主要脂肪酸の炭素数が異なる油脂を意味する。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。また、形質転換体を使用する際は、培養中に

ベクターに存在する耐性遺伝子に対応するカナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を添加しても良い。

【0021】本発明のポリエステルの製造方法においては、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取する。

【0022】炭素源として使用する油脂には特に制限はなく、例えば構成脂肪酸がリノール酸52%、オレイン酸21%、パルミチン酸12%、リノレン酸11%、ステアリン酸3%である大豆油、構成脂肪酸がオレイン酸59%、リノール酸22%、リノレン酸11%、パルミチン酸4%、ステアリン酸2%であるナタネ油、構成脂肪酸がリノール酸51%、オレイン酸35%、パルミチン酸11%、ステアリン酸2%であるコーン油、構成脂肪酸がオレイン酸75%、リノール酸10%、パルミチン酸10%、ステアリン酸3%、リノレン酸1%であるオリーブ油、構成脂肪酸がパルミチン酸43%、オレイン酸41%、リノール酸10%、ステアリン酸5%、ミリスチン酸1%であるバーム油、構成脂肪酸がラウリン酸47%、ミリスチン酸18%、パルミチン酸9%、オレイン酸7%、ステアリン酸3%、リノール酸2%であるヤシ油、構成脂肪酸がラウリン酸44%、オレイン酸17%、ミリスチン酸14%、パルミチン酸3%、リノール酸3%であるバーム核油などの天然物由来の油脂や、炭素数が6以上20以下の脂肪酸、例えば、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸などから1種以上選択された脂肪酸とグリセロールとから合成したトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドなどがあげられる。天然物由来の油脂では炭素数12以下の脂肪酸を構成脂肪酸として40～50%含むヤシ油、バーム核油が好ましい。合成したトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドについては、構成脂肪酸はヘキサン酸が好ましい。

【0023】本発明のポリエステルの製造方法においては、上記油脂として、ヤシ油、バーム油、バーム核油及びヘキサン酸トリグリセリドからなる群より選択される油脂を用いることが好ましい。また、上記脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和または不飽和脂肪酸、これら脂肪酸のエステルや脂肪酸塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。なかでも、炭素数が6～10である飽和または不飽

amura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)). この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸のうちの単一種の脂肪酸を唯一の炭素源として *A. caviae* を培養し、3HHが11~19mol%のP(3HB-co-3HH)を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB)の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV)を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。

【0007】また、*A. caviae*のPHAシンターゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子をP(3HB)を90%以上蓄積する *Alcaligenes eutrophus* に導入した組換え株を用いて、脂肪酸を炭素源としてP(3HB-co-3HH)を生産する報告がなされた。(T. Fukui, Y. doi, *J. Bacteriol.* vol. 179, No. 15, 4821-4830, 特開平10-108682号公報)このなかで、オクタン酸ナトリウムを炭素源とすることで、3HHモル分率が10~20mol%のP(3HB-co-3HH)が生産できると報告している。

【0008】このように、本ポリマーを3HHモル分率を広い範囲でコントロールして共重合体を製造することができれば、硬い共重合体から柔らかい共重合体まで発酵生産可能となり、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの方法では菌体の生産性が低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては適用できない。上述したように、P(3HB-co-3HH)の3HHモル分率をコントロールして生産することは、幅広い分野へ応用するために必要不可欠である。そこで高い菌体生産性とポリマー含量とを保持し、かつ3HHモル分率をコントロールできる生産方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記現状に鑑み、3HHモル分率を制御し、様々な3HHモル分率を有するP(3HB-co-3HH)を高い生産性でかつ安定して製造するポリエステル製造方法を提供することを目的とするものである。

【0010】

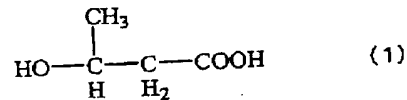
【課題を解決するための手段】本発明者らは様々な検討を行った結果、P(3HB-co-3HH)共重合体を蓄積する微生物を、油脂および/または脂肪酸を炭素源とする培地を使用して培養し、高い生産性を保持し、か

つ安定して3HHモル分率が異なる共重合体を製造することに成功した。

【0011】即ち、本発明は、微生物を用いて、下記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する方法であって、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用いることによって、3HHモル分率の異なるポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。

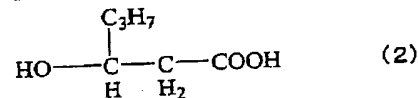
【0012】

【化3】



【0013】

【化4】



【0014】また、本発明の要旨は、P(3HB-co-3HH)共重合体を蓄積する微生物を、少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを添加した培地で培養することで、3HHモル分率が1~40mol%の範囲のP(3HB-co-3HH)共重合体を菌体内に蓄積させ、その培養物からポリマーを採取することとを特徴とする共重合体ポリエステルの製造方法に関する。以下に、本発明の詳細を説明する。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明のポリエステルの製造方法は、微生物を用いて、上記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を生産する際に適用される。上記式(1)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(2)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)は、例えば、下記一般式(3)に示される。

【0016】

【化5】

和脂肪酸、その脂肪酸エステル及び脂肪酸塩からなる群より選択される脂肪酸が好ましい。

【0024】3HHモル分率の高いポリエステルを得るためには、できるだけ炭素数の少ない脂肪酸を含む油脂、脂肪酸を用いることが好ましい。油脂では炭素数が12以下の脂肪酸を比較的多く含むヤシ油、パーム核油、ヘキサン酸トリグリセリドなどが好ましく、また脂肪酸では、炭素数が6~10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル、脂肪酸塩が好ましい。炭素数が6~10である飽和または不飽和脂肪酸、その脂肪酸エステル、脂肪酸塩のなかでも、偶数個の炭素数のものがより好ましく、炭素数6のヘキサン酸が特に好ましい。

【0025】また、本発明のポリエステルの製造方法においては、炭素源として用いる油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、3HHモル分率を制御することが好ましい。天然由来の油脂を炭素源とすると、3HHモル分率が10mol%よりも小さいP(3HB-co-3HH)が生産できる。3HHモル分率が10mol%より大きいP(3HB-co-3HH)を生産するためには、炭素数6~10の脂肪酸またはそのトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドを添加すれば良い。

【0026】本発明のポリエステルの製造方法においては、上記のように少なくとも2種の炭素源として、炭素数の異なる油脂の組み合わせ、炭素数の異なる脂肪酸の組み合わせ、又は、炭素数の異なる油脂と脂肪酸との組み合わせのいずれかを用い、上記油脂または脂肪酸の添加量を変えることによって、得られるポリエステルの3HHモル分率を1~40mol%の間で制御することができる。

【0027】本発明のポリエステルの製造方法において、炭素源である油脂および/または脂肪酸の添加方法としては、特に制限はない。しかし、油脂は一度に大量に添加すると培養液中の溶存酸素濃度を低下させる可能性がある。また脂肪酸は細胞毒性があるため、生育阻害を起こす可能性がある。したがって、これらの添加方法としては、生育阻害を起こさない程度の量を分割して添加する方法や、ベリスタポンプなどを使用し連続添加し、生育阻害を起こさない濃度を維持する方法などが好ましい。分割して添加する場合は、一度に添加する脂肪酸の濃度は1w/v%以下、油脂では5w/v%以下が好ましいが、特に制限されるものではない。また、添加する油脂および脂肪酸の総量は、選択した微生物の生育に影響を与えない程度であれば良く、20w/v%以下が好ましいが、特に制限されるものではない。油脂と脂肪酸とは別々のラインで添加しても良いが、相溶性がある場合は油脂と脂肪酸とを混合して添加した方が、添加ラインを減らすことができるため好ましい。

【0028】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化

アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0029】そのほかの有機栄養源としては、アミノ酸、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなど、ビタミン、例えばビタミンB₁、ビタミンB₁₂、ビタミンC等が挙げられる。

【0030】本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液から遠心分離器などを用いて菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体からクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液から濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルの沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルの回収する。得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

【0031】

〔実施例〕以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0032】(実施例1) *Alcaligenes eutrophus* PHB-4/pJRDEE32d1 3株(T. Fukui., Y. Doi., Appl Microbiol Biotechnol., 49, 333-336, (1998), 受託番号FERM P-15786) (以下Aed13株と略す。)を次のように培養した。前培地の組成は1w/v% Meat-extract, 1w/v% Bacto-Trypton, 0.2w/v% Yeast-extract, 0.9w/v% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.15w/v% KH₂PO₄, (pH6.7)とした。ポリエステル生産培地の組成は1.1w/v% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.19w/v% KH₂PO₄, 0.6w/v% (NH₄)₂SO₄, 0.1w/v% MgSO₄ · 7H₂O, 0.5v/v% 微量金属塩溶液(0.1N塩酸に1.6w/v% FeCl₃ · 6H₂O, 1w/v% CaCl₂ · 2H₂O, 0.02w/v% CoCl₂ · 6H₂O, 0.016w/v% CuSO₄ · 5H₂O, 0.012w/v% NiCl₂ · 6H₂O, 0.01w/v% CrCl₃ · 6H₂Oを溶かしたもの。), 2w/v% プロエキスパ-12(播州調味料), 5×10⁻⁶w/v% カナマイシンとした。炭素源は油脂のみとし、パーム油、パーム核油又はヤシ油4w/v%を3回に分けて添加した。

【0033】Aed13株のグリセロールストックを前培地に接種して20時間培養し、6Lの生産培地を入れた10Lジャーフェーマンター（丸菱バイオエンジニア製MD-500型）に1.5v/v%接種した。運転条件は、培養温度30℃、攪拌速度400rpm、通気量1.8L/minとし、pHは6.6から6.8の間でコントロールした。コントロールには5規定の硫酸と水酸化ナトリウムを使用した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。

【0034】得られた乾燥菌体約30mgに2mlの硫酸-メタノール混液（15:85）と2mlのクロロホルムとを添加して密栓し、100℃で140分間加熱す*

＊ることで菌体内のポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに1mlの蒸留水を添加し、攪拌機を用いて激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm）を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1に示す。

【0035】

【表1】

炭素源	菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3HH分率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
パーム油	35.6	35.9	5.4	12.8
ヤシ油	38.6	64.0	8.6	24.7
パーム核油	37.6	34.9	8.2	13.1

【0036】この結果から、生産性は、ヤシ油を炭素源とした場合、約24g/Lに向上することがわかった。また生産性が向上すると、特開平10-108682号公報に記載の結果とは異なり、3HHモル分率が10mol%よりも小さくなることがわかった。

【0037】（実施例2）炭素源として1）ヤシ油5w/v%、2）ヤシ油4w/v%とヘキサン酸1w/v%、3）ヤシ油3w/v%とヘキサン酸2w/v%、4）ヤシ油2w/v%とヘキサン酸3w/v%、5）ヤシ油1w/v%とヘキサン酸4w/v%、6）ヤシ油 ※

20×0.5w/v%とヘキサン酸5w/v%と様々に割合を変えて油脂と脂肪酸とを添加した。ヤシ油は接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とヘキサン酸とは混合して約10ml/minの速度で24~60時間までの間にペリスタポンプで連続添加した。それ以外は実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、分析を行った。その結果を表2に示す。

【0038】

【表2】

炭素源(w/v%)		菌体量 (g/L)	ポリマー含量 (wt%)	3HH分率 (mol%)	ポリマー生産性 (g/L)
ヤシ油	ヘキサン酸				
5.0	0.0	45.0	62.5	8.1	28.1
4.0	1.0	42.9	63.7	9.9	27.3
3.5	1.5	41.4	54.3	10.5	22.5
3.0	2.0	34.3	41.1	15.8	14.1
2.0	3.0	35.5	36.6	18.5	13.0
1.0	4.0	18.5	9.6	32.0	1.8
0.5	5.0	生育せず	—	—	—

【0039】この結果から、ヘキサン酸の割合が0~4w/v%に増加するにしたがって、3HHモル分率が8.1~32mol%に増加することが分かった。

【0040】（実施例3）炭素源としてヤシ油4w/v%とヘキサン酸トリグリセリド（HTG）1w/v%とを用いた。ヤシ油のみの場合は5w/v%添加した。実施例1と同様の培地を使用し、1.8Lの生産培地を入れた3Lジャーフェーマンター（丸菱バイオエンジニア製MDL-300型）を用い培養を行った。運転条件は培養温度30℃、攪拌速度550rpm、通気量1.8L/minとし、pHを6.6から6.8の間で5規定の硫酸と水酸化ナトリウムとでコントロールした。接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とHTGとは混合して3等分し、接種後24、36、48時間に添加した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。実施例1と同様の分析を行った。その結果を表3に示す。

40 minとし、pHを6.6から6.8の間で5規定の硫酸と水酸化ナトリウムとでコントロールした。接種時にヤシ油を0.5w/v%添加し、残りのヤシ油とHTGとは混合して3等分し、接種後24、36、48時間に添加した。培養は72時間まで行った。遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。実施例1と同様の分析を行った。その結果を表3に示す。

【0041】

【表3】

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3HH分率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+HTG	39.9	56.5	9.8

【0042】この結果から、炭素源の一部をHTGに変更すると3HHモル分率が向上することが分かった。

【0043】(実施例4) 実施例1と同じ培地、ジャーファーメンターを使用し、同じ運転条件で培養を行った。炭素源はヤシ油4w/v%にヘキサン酸0.5w/*

*v%またはオクタン酸0.5w/v%を混ぜて実施例1と同様に連続添加した。ヤシ油のみの場合は5w/v%添加した。分析結果を表4に示す。

【0044】

【表4】

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマー含量(wt%)	3HH分率(mol%)
ヤシ油	49.9	66.1	7.3
ヤシ油+ヘキサン酸	45.5	57.2	8.6
ヤシ油+オクタン酸	39.8	51.1	9.0

【0045】この結果から、添加する脂肪酸を変えることで、3HHモル分率の異なるポリマーが得られた。

【0046】

【発明の効果】本発明により、生分解性ポリマーであるP(3HB-co-3HH)共重合体を、物性を大きく※

※変化させる3HHモル分率を1~40mol%の範囲で任意に制御して、高い生産性かつ安定して生産することが可能となり、応用範囲の広い本ポリマーを提供できるようになる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
(C12P 7/62 C12R 1:05)		C12R 1:05) C12N 15/00	A
(72)発明者 小田原 修 兵庫県高砂市西畑1丁目13番1-303		Fターム(参考)	4B024 AA03 BA80 CA03 DA05 EA04 -GA11
(72)発明者 松本 圭司 兵庫県西宮市大森町11-33			4B064 AD83 CA02 CA19 CB03 CC24 CD07 DA16
(72)発明者 土肥 義治 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内			4B065 AA10Y AA12X AB01 AC14 BA02 BB08 CA12 CA60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)